

- 1 -

Verwendung eines VEGF-Rezeptorgens oder -genprodukts

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Verwendung des VEGF-Rezeptorgens bzw. -genprodukts in der Prävention oder Behandlung von
5 Restenose, Ischämie, Arteriosklerose und allgemein bei Zuständen, die mit überschießender Proliferation der Gefäßwandzellen verbunden sind.

Weiterhin richtet sich die Erfindung auf Vorrichtungen zur lokalen Applikation von VEGF-Rezeptorgen bzw. -genprodukt, insbesondere auf Stents enthaltend
10 das VEGF-Rezeptorgen bzw. -den Rezeptor.

Hintergrund der Erfindung

Jährlich werden in Deutschland ca. 150 000 Ballonkatheter-gestützte
15 Erweiterungen verengter Herzkranzgefäße durchgeführt. Nach vorliegenden kontrollierten Studien muss bei etwa 20 % von ihnen mit einer so hochgradigen Wiederverengung (der sogenannten Restenose) gerechnet werden, so dass erneut Beschwerden auftreten und eine erneute Behandlung erforderlich wird (Fishman DL, Leon MB, Baim DS, et al.; A randomized comparison of coronary
20 stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease; New Engl J Med 1994,331:496-501; Serruys PW, De Jaegere P, Kiemeneji F, et al.; A comparison of balloon expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease; New Engl J Med 1994,331:489-495). Dieser Restenose liegt ursächlich eine überschießende
25 Proliferation (Gewebsneubildung) der Gefäßinnenschicht (Intima) zugrunde, die zu einer Einengung des Innenraums (Lumen) führt (Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King SB; 3d. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: An animal model of restenosis; J Am Coll Cardiol 1992, 20: 467-474; Hoffmann R, Mintz GS,
30 Dussaillant GR, et al. Patterns and mechanisms of in-stents restenosis: A serial ultrasound study; Circulation 1996, 94: 1 247-1254). Dieser Prozess tritt

- 2 -

grundsätzlich bei allen Patienten nach einer solchen Behandlung auf, erreicht jedoch bei ca. 20% der Patienten ein kritisches Ausmaß. Gründe dafür, warum nur ein Teil der Patienten betroffen ist, sind nicht vollständig geklärt, ebenso wenig sind die Signalwege, die diese proliferative Heilungsreaktion steuern, bekannt. Dieser Prozess ist regelhaft nach einigen Monaten (i.d.R. nach 6 Monaten, nach einigen wenigen Studien nach 9 Monaten) abgeschlossen, d.h. wenn es bis dahin nicht zu einer Wiederverengung gekommen ist, tritt danach auch keine mehr auf. Es ist weiterhin beobachtet worden, dass die Proliferation dann endet, wenn der Gefäßabschnitt wieder eine vollständige Innenauskleidung (Endothel) hat (Terman BI, Dougher-Vermozen M, Carrion ME, Dimitrow D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P.; Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor; Biochem Biophys Res Commun 1992,187:1579-1586; Clowes AW, Collazzo RE, Karnovsky MJ; A morphologic and permeability study of luminal smooth muscle cells after arterial injury in the rat; Lab Invest 1978,39:141-150). Diese normalerweise vorhandene Zellschicht wird durch die Krankheit Arteriosklerose selbst bzw. durch eine Ballondehnung praktisch vollständig zerstört und muss neu gebildet werden. Nach den wenigen vorhandenen Daten von Patienten, die kurz nach einer Ballondehnung verstarben und im Rahmen einer Sektion untersucht wurden, vor allem aber nach tierexperimentellen Untersuchungen, nimmt diese Regeneration des Endothels mehrere Wochen in Anspruch. Solange läuft aber die Proliferation der Gefäßwand in diesem Bereich weiter und führt u.U. zu einer kritischen Wiederverengung des Gefäßlumens.

25 Mitte der neunziger Jahre konnte gezeigt werden, dass diese Endothelregeneration beschleunigt werden kann und dann auch weniger Gefäßwandproliferation in einem tierexperimentellen Modell eintritt (Asahara T, Bauters C, Pastore C, Keamey M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM; Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery; Circulation 1995,91:2793- 2801; Asahara T, Chen D, Tsunami

- 3 -

Y, Kearey M, Rossow S, Passeri J, Symes JF, Isner J M; Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer; Circulation 1996,94:3291-3302). Die Autoren verwendeten dazu den Endothelzell-spezifischen Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), den sie entweder als Protein einsetzten oder aber die dafür kodierende DNA lokal im Gefäß überexprimierten. VEGF wird (patho-) physiologischerweise nach einer Gefäßwandverletzung lokal gebildet (Chen YX, Nakashima Y, Tanaka K, Shiraishi S, Nakagawa K, Sueishi K; Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in atherosclerotic intimas of human coronary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999,19:131-139).

Beide Ansätze zur Vermehrung dieses Wachstumsfaktors waren im Hinblick auf die Gefäßwandproliferation wirksam.

15

Die endotheliale Aktivität des VEGF's wird durch zwei hoch affine Tyrosinkinase Rezeptoren, flt-1 und KDR vermittelt. Das murine Homolog zum KDR Rezeptor ist flk-1. Beide Rezeptoren haben sieben immunoglobulinartige Domänen, eine Transmembran Domäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinase Domäne. Während KDR/flk-1 hoch affin nur mit VEGF bindet, findet beim flt-1 Rezeptor eine hoch affine Bindung neben VEGF auch mit PLGF (placenta growth factor) statt.

20

Die oben beschriebene Aktivität des VEGF kann allerdings in beiden oben aufgezeigten Fällen, lokaler Einsatz des Proteins oder lokale Überexpression der DNA kodierend für VEGF, auch zu einer Erhöhung der im Blut zirkulierenden Konzentration von VEGF führen, dass physiologischerweise nicht bzw. in nicht nachweisbaren Konzentrationen vorkommt.

25

Dieser Befund ist insofern von wesentlicher Bedeutung als VEGF mit seiner Endothelzellwachstums-fördernden Wirkung eine essentielle Rolle in der

30

- 4 -

Gefäßneubildung in bösartigen Tumoren spielt. Damit hatte eine solche Behandlung mit VEGF oder dessen DNA zur Vermeidung der Restenose potentiell eine zu vermeidende unerwünschte Wirkung, nämlich die Förderung des Wachstums eines bis dahin unerkannten Tumors.

5

Daher liegt der Erfindung insbesondere die Aufgabe zugrunde die Entwicklung der Restenose bei einer experimentellen Ballonkatheterbehandlung zu verhindern, hervorgerufen durch eine übermäßige Entstehung von Neointimazellen im behandelten Bereich unter Vermeidung der oben
10 dargestellten Probleme. Weiterhin bestand die Aufgabe die Entstehung von Ischämie, Arteriosklerose und Tumoren zu beschränken sowie eine Behandlung zu ermöglichen.

Zusammenfassung der Erfindung

15

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem Aspekt die Verwendung von VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt (Rezeptor) zur Vorbeugung oder Behandlung von Restenose, insbesondere hervorgerufen durch eine Ballonkatheterbehandlung der Koronargefäße, Ischämie oder Arteriosklerose

20

Speziell betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines VEGF-Rezeptorgens oder -genprodukts zur Herstellung einer Zubereitung, die insbesondere zur lokalen Applikation geeignet ist und verwendbar zur Vorbeugung und Behandlung von mit überschießender Neointimaproliferation einhergehenden
25 Zuständen und Krankheiten, insbesondere von Arteriosklerose und Ischämie, zur Förderung von Neovaskularisationen und zur unterstützenden Therapie bei Shunts, zur lokalen Behandlung von Schädigungsgebieten des Gefäßendothels, insbesondere vor, während oder nach Angioplastie, sowie zur Restenose-Prophylaxe.

30

- 5 -

Das VEGF-Rezeptorgen ist insbesondere eine für humanes KDR/flk-1 kodierende Sequenz, das Genprodukt ist vorzugsweise KDR (Kinase insert domain-containing receptor) flk-1.

- 5 Die Zubereitung kann weitere pharmazeutisch verträgliche Zusatz- und Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

Sie kann zur Unterstützung des gewünschten erfindungsgemäßen Effekts auch Mittel enthalten, die die Synthese, Expression und/oder Stabilität des Rezeptors
10 am Wirkort modulieren, beispielsweise durch Modulation der Synthese, Expression, Stabilität einer für einen VEGF-Rezeptor kodierenden mRNA. Hierdurch kann die gewünschte vermehrte Anwesenheit des Rezeptors am Wirkort zusätzlich beeinflusst werden.

- 15 Die Zubereitung kann innerhalb einer Vorrichtung zu ihrer Zuführung oder auf, an oder in einem Implantat, insbesondere einem Stent, für die Applikation vorgehalten werden.

Verfahren zur Behandlung von Patienten, die einer Ballonkatheterbehandlung
20 unterworfen wurden oder vorbeugend bei Patienten, bei denen ein Risiko für Restenose, Ischämie oder Arteriosklerose besteht, mit einem VEGF-Rezeptorgen oder Genprodukt fallen ebenfalls in den Umfang des Patents.

Insbesondere erfolgt die Verwendung und die Behandlung durch lokale
25 Applikation des VEGF-Rezeptorgens oder Genprodukts.

Ein zugehöriges Verfahren umfasst die lokale Applikation einer wirksamen Menge an VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt in die betroffenen Bereiche, wobei die Applikation mit Hilfe eines Stents oder Ballonkatheters erfolgen kann.

- 6 -

- Besonders vorteilhaft handelt es sich dabei um eine transiente Expression des VEGF-Rezeptors in den betroffenen Bereichen, z.B. durch transiente Transfektion von Zellen mit einem Expressionsvektor der das Gen kodierend für den VEGF-Rezeptor enthält. Insbesondere wird erfindungsgemäß eine transiente
- 5 Transfektion des durch eine Stent- oder Ballonkatheter- Behandlung geschädigten Gewebes mit dem VEGF Rezeptorgen erzielt. Diese trägt zur Regeneration dieser Gewebe bei und reguliert die Neuentstehung von Endothelzellen. Häufig wird eine einmalige Applikation genügen.
- 10 Die Applikation kann zum Zeitpunkt der Ballonkatheter-gestützten Erweiterung verengter Herzgefäße erfolgen.

In einem weiteren Aspekt richtet sich die Erfindung auf Vorrichtungen, wie einen Stent, oder einen Ballonkatheter, die das VEGF-Rezeptorgen oder

15 Genprodukt enthalten.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 zeigt den Nachweis des CMV-Promotors in verschiedenen Geweben behandelte Tiere als Nachweis der lokalen Transfektion von Zellen durch den

20 eingeführten Expressionsvektor.

Abb. 2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression der VEGF-Rezeptor KDR/flk-1 mRNA in transfizierten Tieren.

25

Abb. 3 stellt die Fläche des Lumens und der Neointima bei mit KDR/flk-1 Transfektionsvektor behandelten Tieren und bei mit der Kontrolle behandelten Tieren dar.

30 Abb.4 stellt die Dicke der Neointima bei mit KDR/flk-1 Transfektionsvektor behandelten Tieren und bei mit der Kontrolle behandelten Tieren dar.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

- Mit dem Ausdruck VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt, wie er hier verwendet wird, sind alle DNA-Sequenzen und Polypeptide gemeint, die auf Proteinebene in der Lage sind VEGF mit hoher Affinität zu binden und intrazellulär die zugehörige Signalkaskade auszulösen, insbesondere der KDR/flk-1 Rezeptor (KDR steht für kinase insert domain-containing receptor), das murine Homolog davon, flk-1 (flk-1 steht für fetal-liver-kinase-1), sowie die DNA Sequenzen und die entsprechenden degenerierten Sequenzen kodierend diese Proteine. Zu den für die Erfindung geeigneten Rezeptoren gehört auch der Tyrosinkinase-Rezeptor flt-1. Dabei können sowohl die DNA auch als das Polypeptid Veränderungen in ihren Sequenzen aufweisen, wie eine Mutation, z.B. Deletion, Austausch und/oder zusätzliche Nukleotid- oder Aminosäuremoleküle. Diese Mutationen können z.B. 1 bis 20, bevorzugt 1 bis 10 Mutationen auf Proteinebene umfassen. Wichtig ist dabei, dass die Aktivität des VEGF-Rezeptors erhalten bleibt, d.h. das VEGF zu binden. Unter diesen Ausdruck fallen auch Fragmente oder Teile des VEGF-Rezeptors solange diese den VEGF bindenden Bereich umfassen und somit in der Lage sind VEGF zu binden.
- Die vorliegende Erfindung betrifft in einem Aspekt die Verwendung von VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt in der Vorbeugung oder Behandlung von Restenose, insbesondere hervorgerufen durch eine Ballonkatheterbehandlung der Koronargefäße.
- Weiterhin betrifft die Erfindung in einem zweiten Aspekt die Verwendung von VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt in der Vorbeugung und Behandlung der Ischämie und der Arteriosklerose. Diese Erkrankungen können ebenfalls gekennzeichnet sein durch eine übermäßige Proliferation von Neointimazellen (Gefäßwandzellen).

- 8 -

Die Verwendung des VEGF-Rezeptorgens oder des Rezeptors ist weiterhin möglich zur Beschleunigung der Endothelauskleidung von sog. Transjugulären Intrahepatischen Porto-Systemischen (TIPS) Shunts. Hierbei wird Patienten mit Lebercirrhose und Pfortaderhochdruck von einem Halsvenenzugang aus innerhalb der Leber ein Kanal zwischen Pfortader und Hohlvene geschaffen, um den erhöhten Pfortaderdruck zu senken. Dieser Kanal wird mit Stents stabilisiert. Allerdings kommt es bei einem erheblichen Teil der Patienten über eine starke Proliferation in den Stents zu einer hochgradigen Einengung, so dass Folgebehandlungen notwendig werden. Auch diese proliferative Reaktion kann durch Beschleunigung der Endothelbildung mittels der Behandlung mit dem VEGF-Rezeptor oder dessen DNA gebremst werden und so eine kritische Einengung verhindert werden.

Eine weitere erfindungsgemäße Verwendung besteht darin durch (insbesondere lokale) Gabe von VEGF-Rezeptor oder zugehöriger DNA Neovaskularisationen zu unterstützen, indem ein Verstopfen der neuen Gefäße durch überschießende Neointimaproliferation verhindert wird. Unter anderem ist die erfindungsgemäße Verwendung geeignet bei der direkten Myokardneovaskularisation. Hierbei werden mittels kleiner Bohrungen oder mittels Laserbehandlung 1 - 2 mm durchmessende Kanäle in Abschnitte des Herzmuskels geschaffen, in der Hoffnung, dass sich daraus neue Blutgefäße bilden. Dieses Verfahren wird angewandt, wenn konventionelle Verfahren wie Bypasschirurgie oder Ballondilatation aufgrund gänzlich obliterierter eigener Gefäße nicht mehr angewendet werden können. Leider kommt es meist nicht zu der gewünschten Bildung neuer Gefäße, sondern die geschaffenen Kanäle verschließen sich wieder. Daher kann hierbei durch die Behandlung mit dem Rezeptor von VEGF oder dessen DNA eine Gefäßneubildung gefördert werden.

Verfahren zur Behandlung von Patienten, die einer Ballonkatheterbehandlung unterworfen wurden oder vorbeugend bei Patienten, bei denen ein Risiko für

- 9 -

Restenose, Ischämie oder Arteriosklerose besteht, mit einem VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt fallen ebenfalls in den Umfang des Patents.

Insbesondere erfolgt die Verwendung und die Behandlung durch lokale
5 Applikation des VEGF-Rezeptorgens oder -genprodukts.

Besonders vorteilhaft handelt es sich dabei um eine transiente Expression des VEGF-Rezeptors in den betroffenen Bereichen, z.B. durch transiente Transfektion von Zellen mit einem Expressionsvektor der eine DNA Sequenz
10 kodierend für den VEGF-Rezeptor oder Teilen davon enthält.

In einem weiteren Aspekt richtet sich die Erfindung auf Vorrichtungen, wie einem Stent, die das VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt enthalten, z.B. in Form von Nanopartikeln, Mikropartikeln, Mikro- und Nanospheren oder als
15 injizierbare Lösung.

Das Verfahren zur Behandlung von Patienten, die z.B. einer Ballonkatheterbehandlung unterworfen werden, umfasst die lokale Verabreichung einer ausreichenden Menge an z.B. Expressionsvektor enthaltend
20 eine Sequenz kodierend für den VEGF-Rezeptor oder das Protein selbst in einer Art und Weise, die als Ergebnis eine regulierte Freisetzung eines Proteins ermöglicht, welches das VEGF hoch affin bindet und so eine überschießende Proliferation der Neointimazellen verhindert. Das Auftreten von VEGF im Blut des Patienten mit möglichen nachteiligen Folgen wird durch die gezielte, lokale
25 Anwendung des Rezeptors an Stelle des Faktors vermieden. Die Menge an zu applizierendem VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt hängt von der Konstitution des Patienten, dem Behandlungsausmass usw. ab und kann durch den Fachmann einfach bestimmt werden.

30 Die Gabe erfolgt im Falle der Ballonkatheterbehandlung vorteilhaft während dieser Behandlung lokal am Behandlungsort. Im Falle einer Ischämie,

- 10 -

Arteriosklerose, begleitender Behandlung bei Shunts oder für die Neovaskularisation wird das VEGF-Rezeptorgen oder Genprodukt lokal in oder in die Nähe des Behandlungsortes appliziert.

- 5 Die Gabe kann zum Beispiel erfolgen, indem der Stent bei der Ballonkatheterbehandlung so präpariert wird, dass das VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt, z.B. in Form eines Expressionsvektors an das unmittelbar an den Stent angrenzende Gewebe abgegeben wird. Der wirksame Bestandteil kann also z.B. in Form von Mikrokapseln, Nanokapseln, Liposomen und reguliert
- 10 freisetzenden Präparationen vorliegen; diese können z.B. in Form einer Beschichtung auf den Stent oder Teile davon aufgebracht sein.

Dieses erlaubt einerseits im Falle der Verwendung von Expressionsvektoren mit einer für den VEGF-Rezeptor kodierenden DNA Sequenz, dass eine Transfektion

15 des umliegenden Gewebes mit einer sich ergebenden Expression des Rezeptors erfolgt. Vorteilhaft findet diese Transfektion transient statt, z.B. mit einer Expression der Zielsequenz über 3 bis 4 Wochen.

Andererseits kann auch rekombinanter Rezeptor in einer Form verabreicht

20 werden, die eine kontrollierte Freisetzung über einen längeren Zeitraum erlaubt. Diese Formulierung schließt Nano- und Mikrokapseln und -sphären ein. Diese Form kann z.B. ein rekombinanter Rezeptor bzw. Polypeptid sein, umfassend die Bindungsdomänen für das VEGF in einer Art und Weise, dass es VEGF bindet. Gegebenenfalls kann das Rezeptorprotein an ein geeignetes

25 Transportvehikel für den beschleunigten oder verbesserten Transport in die Zielzellen des betroffenen Gewebes bzw. die Zellwände des Gefäßes gekoppelt sein. Hierfür bieten sich im Stand der Technik bekannte Transportproteine oder -peptide an.

- 11 -

Der Expressionsvektor, der zur gegebenenfalls transienten Transfektion des lokalen Gewebes verwendet werden kann, kann ein für die Verwendung in Säugetieren, wie den Menschen, üblicherweise verwendeter sein.

- 5 Die Applikation kann auch in Form von Lösungen zur Injektion erfolgen, z.B. im Falle einer Ischämie. Dann wird das VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt mit entsprechenden weiteren pharmazeutisch annehmbaren Komponenten, wie Verdünner, Träger etc. formuliert und dem Patienten verabreicht.
- 10 Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Erkenntnis beruht zum einen auf dem Befund nach dem in den ersten Tagen nach einer experimentellen Ballonkatheterbehandlung der Agonist VEGF früher und starker exprimiert wird als sein Rezeptor (Buchwald AB, Meyer T, Stevens J, et al.; Vascular endothelial growth factor expression in reendothelialisation and
- 15 neovascularisation in a coronary angioplasty model; 1997, Eur Heart J 18:154). Es ist also zu einem frühen Zeitpunkt bereits der Wachstumsfaktor VEGF (Agonist des VEGF-Rezeptors) vorhanden, während der für die Signalvermittlung erforderliche Rezeptor noch nicht gebildet wird. Bei der Transfektion nicht der DNA des Wachstumsfaktors selbst, sondern der seines
- 20 Rezeptors, der seine Wirkung als Protein in Zellwänden mit 7-transmembranösen Domänen entfaltet, ist keine entfernte biologische Wirkung auf bereits vorhanden (Tumor-) Zellen zu erwarten, weil eine Inkorporation eines Proteins aus dem Blut in vorhandene Zellwände mit anschließend wirksamer Funktion nicht stattfindet, selbst wenn eine lokale Überexpression an einer
- 25 Stelle des Gefäßsystems, wie einer Herzkranzarterie, zu einer messbaren Zirkulation von Rezeptor-Protein im Blut führen würde.

Es wurde gezeigt, dass die lokale Überexpression des Rezeptors zu einer verringerten proliferativen Gefäßwandreaktion führt.

- 12 -

Damit wird jedoch nicht nur ein neuer Ansatz zur Vermeidung der Restenose nach Koronarangioplastie aufgezeigt, sondern gleichzeitig auch erstmals dargestellt, dass für eine biologische Wirkung nicht das Vorhandensein bzw. die lokale Wirkkonzentration des Agonisten VEGF Geschwindigkeits-bestimmend ist, sondern dass hier dem Rezeptor die für den Wirkungsbeginn entscheidende Bedeutung zukommt.

Mit Hilfe der Beispiele wird gezeigt, dass die lokale Transfektion der DNA für den VEGF-Rezeptor KDR/flk-1 mittels eines Ballon-Seitenloch-Katheters zur lokalen Behandlung zu einer ausgeprägten Verstärkung der KDR/flk-1 mRNA-Expression um den Faktor 10 gegenüber Kontroll-transfizierten Gefäßen führt. Dies resultiert in einer signifikanten Verringerung der neointimalen Proliferation als der wesentlichen Determinante der Wiederverengung in Stents (In-Stent-Restenose). Dieser Effekt wurde beispielhaft mit einer einmaligen Gabe nackter DNA in einem CMV-Promotor zum Zeitpunkt der Angioplastie erreicht.

Diese Ergebnisse sind der erste Beleg dafür, dass nicht nur der Agonist VEGF, sondern auch sein Rezeptor KDR/flk-1 Geschwindigkeits-bestimmend für den Prozess der letztlich Proliferations-begrenzenden Endothelregeneration ist. Erfindungsgemäß ist es möglich, die endogene VEGF-Expression nach einer Angioplastie ausreichend schnell eintreten zu lassen, um das Endothel schnell zu regenerieren und die Proliferation in der Gefäßwand zu bremsen, wenn sein Rezeptor KDR/flk-1 zeitgerecht und ausreichend verfügbar ist.

Das erfindungsgemäß erreichte Ausmaß der Proliferationshemmung ist vergleichbar mit dem, das durch Behandlung mit VEGF in früheren Studien gefunden wurde. Dadurch wird ebenfalls belegt, dass dieser Rezeptor in diesem Modell Geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Überexpression des Rezeptors erfolgt nicht länger als in Kontroll- oder in nichttransfizierten Gefäßen. Wie z.B. bei Verwendung nackter DNA zu erwarten, wird keine stabile Transfektion erreicht, die zu einer dauerhaften (Über-) Expression des Rezeptors führt. Dies

- 13 -

ist auch bei einigen Anwendungen gewollt, weil z.B. bei der Ballonkatheterbehandlung der Prozess der Lumeneinengung nach der Regeneration des Endothels zum Stillstand kommt und eine weitere Wirkung unnötig wäre. Bei anderen Anwendungen kann hingegen eine stabile
5 Transfektion vorteilhaft sein.

Darüber hinaus kann VEGF, dass sowohl bei Gabe des Proteins wie auch nach lokaler Transfektion in die Blutzirkulation gelangt, unerwünschte Wirkungen im Körper hervorrufen, einschließlich der potentiellen Gefahr einer Verstärkung des
10 Gefäßwachstums in unerkannten Tumoren. Erfindungsgemäß wurde keine Expression der transfizierten DNA in einem anderen Organ gefunden als dem Zielorgan gefunden. Da aber der funktionierende KDR/flk-1-Rezeptor 7-transmembranöse Domänen hat ist eine Wirkung dieses Proteins, selbst wenn es in die Blutzirkulation gelangt, nicht zu erwarten. Hierzu wäre eine
15 Inkorporation des Rezeptors aus dem Blut in Zellmembranen zu fordern, die bisher nicht bekannt ist.

Die erfindungsgemäße Verwendung von VEGF-Rezeptorgen und -genprodukt kann eine gegebenenfalls lokale Transfektion der DNA für den VEGF-Rezeptor
20 KDR/flk-1 bewirken, die einen neuen Ansatz zur Gen-Therapie der Restenose zeigt. Weiterhin ist erfindungsgemäß auch eine Behandlung schwerer atherosklerotischer Veränderungen mit ge- bzw. zerstörtem Endothel möglich, etwa zur Vermeidung der Plaqueruptur mit nachfolgender intravasaler Thrombose und Herzinfarkt.

25 Weiterhin ist erfindungsgemäß die Verwendung bei der Prävention und der Behandlung von Ischämie möglich.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, wie der Stent, enthaltend das VEGF-
30 Rezeptorgen oder -genprodukt, kann ein herkömmlicher Stent sein, der

- 14 -

entsprechend mit dem VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt in einer üblichen Formulierung präpariert ist.

Im Folgenden wird unter Bezugnahme auf Beispiele die Erfindung näher
5 erläutert. Dem Fachmann ist aber klar, dass diese Beispiele verändert werden können, um die vorliegende Erfindung zu erzielen. Die Beispiele dienen vielmehr zum besseren Verständnis der Erfindung.

Beispiele:

Beispiel 1

Als tierexperimentelles Modell (Buchwald AB, Unterberg C, Nebendahl K, Grone
HJ, Wiegand V; Low-molecular weight heparin reduces neointimal proliferation
15 after coronary stent-implantation in hypercholesterolemic minipigs; Circulation
1992, 86: 53 1-537; Unterberg C, Sandrock D, Nebendahl K, Buchwald AB;
Reduced acute thrombus formation results in decreased neointimal proliferation
after coronary angioplasty; J Am Coll Cardiol 1995,26:1747-1754) wurden
Minischweine (Versuchstiergut Relliehausen) verwendet. Die Tiere wurden mit
20 Azaperon sediert und anschließend mit Halothan narkotisiert, oral intubiert und
beatmet. Die Narkose wurde mit Fentanyl/Dipidolor aufrechterhalten. Nach
Freilegung einer Arteria carotis wurde ein 7 fr Führungskatheter unter
Bildwandlerkontrolle in die Aorta ascendens vorgeschoben und die
Herzkranzarterien dargestellt. Dann erfolgte in 2 Gefäßen eine
25 Ballonkatheterdehnung mit Stent-Implantation. Unmittelbar anschließend wurde
ein InfiltratorTM-Katheter an beide behandelten Stellen vorgeschoben. Beim
Aufblasen des Ballons dieses Katheters werden 2 Reihen mit je 5 Öffnungen an
die Gefäßwand gepresst, durch die DNA (je 0,2 mg, entweder KDR/flk 1 oder
LacZDNA, siehe unten) in einem Volumen von 0,4 ml injiziert wurde.
30 Diejenigen, die die Versuche durchführten, wussten nicht, welches Gefäß mit

- 15 -

der KDR/flk-1-DNA behandelt wurden. Danach wurde der Ballon abgelassen, die Katheter entfernt, die Halswunde vernäht und die Narkose beendet.

- Von 22 Tieren in dieser Untersuchung verstarben 3 nach irreversiblen
5 Kammerflimmern als Folge von Koronarspasmen und nachfolgender Myokardischämie nach der initialen Angioplastie vor der DNA-Injektion. Diese Tiere wurden in der folgenden Auswertung nicht berücksichtigt. Alle anderen Tiere überlebten komplikationsfrei bis zum geplanten Versuchende.
- 10 Die Tiere wurden in ihren Ställen für die Dauer der geplanten Nachbeobachtungszeit gehalten. Diese betrug 2, 4, 7 oder 28 Tage. Anschließend wurden den Tieren nach Eröffnung des Brustkorbs in tiefer, irreversibler Narkose das Herz entnommen. Nach Perfusionsfixierung in
15 Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung bei 100 mmHg wurden die Herzen mit 4%igem Formaldehyd (1000 ml) perfusionsfixiert. Die behandelten Gefäßsegmente wurden entnommen und in Methylmetacrylat eingebettet. 3-5 Schnitte (0,4 μ m) wurden nach Elastica-van-Giesson-Färbung morphometrisch unter Verwendung einer digitalen Mikroskop-Kamera und dem Programm ImageProTM (Version 2.0, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) analysiert. Die Flächen
20 von Lumen, neugebildeter Intima and Dicke dieser Neo-Intima über jedem Stentdraht-Anschnitt wurden vermessen. Die Eindringtiefe bzw. der Verletzungsgrad durch den Stent wurde für jeden Schnitt semi-quantitativ auf einer Skala von 1 (oberflächlich) bis 4 (Draht in der Adventitia) bestimmt, wie von Schwartz et al; beschrieben (Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, et al.;
25 Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: Results in a porcine model; J Am Coll Cardiol 1992, 1 9: 267-274). Dem Auswerter war die Art der Behandlung der Segmente nicht bekannt.

Proliferation der Gefäßwand nach Angioplastie

Der Verletzungsgrad in KDR/flk-1 und in LacZ-transfizierten Kontrollen war mit 2.08 ± 0.11 bzw. 2.10 ± 0.12 vergleichbar. In KDR/flk-1 transfizierten Gefäßen war die minimale Lumenfläche größer und die Neointimafläche (Abb. 4), ebenso wie die maximale Neointima-Dicke (Abb. 4), waren kleiner als in LacZ-behandelten Gefäßen. Diese Unterschiede, die einen mittleren Lumengewinn um die Hälfte der Werte in den LacZ-behandelten Gefäßen bzw. eine Verringerung der Neointimafläche um die Hälfte ausmachten, waren signifikant.

Für die Durchführung der in-situ-Hybridisierung zur Detektion der mRNA wurde von den Gefäßsegmenten vor Methylmetacrylateinbettung ein 3 mm langes Stück abgetrennt, daraus die Stentdrähte entfernt und dies in Paraffin eingebettet.

Verwendete DNA: Ein eukaryontischer Expressionsvektor, der den CytomegalieVirus-Promotor pcDNA3.1 (Invitrogen, Groningen, Niederlande) und die linearisierte cDNA für humanen VEGF-Rezeptor KDR/flk-1 enthielt (Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH; Different signal transduction properties of KDR and Flt 1, two receptors for vascular endothelial growth factor; Biol Chem 1994, 269:26988-26995), wurde verwendet. Das Plasmid pcDNA 3 LacZ (Invitrogen, Groningen, Niederlande), das eine an den Promotor gekoppelte "nuclear targeted" β -Galaktosidase Sequenz enthielt, wurde für Kontrolltransfektionen verwendet.

Zur Prüfung einer erfolgreichen Transfektion und zum Ausschluss der Expression der transfizierten DNA in anderen Organen wurden Proben aus Leber, Milz, Nieren und Lunge auf das Vorhandensein der mRNA des CMV-Promotors untersucht. Zur Bestätigung einer erfolgreichen Transfektion wurde eine in-situ-Hybridisierung unter Verwendung von Primern für das CMV-Promotor-Gen durchgeführt.

- 17 -

Unter RNase-freien Bedingungen wurden Gewebsschnitte entparaffiniert und mit Paraformaldehyd fixiert, mit Protein Kinase K (Sigma, München) angedaut, erneut dehydriert und dann ein Hybridisierungs-Mix mit einer Digoxigenin-markierten CMV-Promotor Sonde zugegeben. Diese Sonde wurde mit dem PCR

5 DG probe synthesis Kit (Roche, Mannheim) und folgenden Primern hergestellt: 5'GCT GAC CGC CCA ACG AC3' und TAC ACG CCT ACC GCC CAT TT3'; es resultiert eine Sonde mit 448 Basenpaaren. Ein Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde zugegeben mit dem NBT/BCIP Färbe-Kit angefärbt (DAKO, Hamburg).

10 Ausschließlich in den transfizierten Gefäßen wurde die mRNA nachgewiesen, alle anderen untersuchten Organproben waren negativ (Abb.1). Hierzu wurden Experimente mit 2 Tagen (n=2), 4 Tagen (n=4) und 7 Tagen (n=3) sowie mit 4 wöchiger Nachbeobachtungsperiode (n=10) analysiert.

15 Expression von KDR/flk-1

Zur Bestätigung einer erfolgreichen Transfektion wurde eine in-situ-Hybridisierung unter Verwendung von Primern für das CMV-Promotor-Gen durchgeführt. Das CMV-Promotor-Gen wurde ausgewählt, da die in-situ-

20 Hybridisierung für KDR/flk-1 sowohl in transfizierten wie auch in Kontroll-dilatierten Tieren aufgrund der endogenen Expression dieses Rezeptors positiv ist. Eine Differenzierung zwischen der mRNA nach Transfektion der (humanen) DNA und der endogenen (porcinen) mRNA war nicht möglich, da die komplette Sequenz der porcinen DNA nicht bekannt war, auch aufgrund der hohen

25 Homologie zwischen beiden Spezies spezifische Primer nicht synthetisiert werden konnten.

In-situ-Hybridisierung

30 Unter RNase-freien Bedingungen wurden Gefäßschnitte entparaffiniert und mit Paraformaldehyd fixiert, mit Protein Kinase K (Sigma, München) angedaut,

- 18 -

erneut dehydriert und dann ein Hybridisierungs-Mix mit einer Digoxigenin-markierten KDR/flk-1 Sonde zugegeben. Diese Sonde wurde mit dem PCR DG probe synthesis Kit (Roche, Mannheim) und folgenden Primern hergestellt:

5' GAA CTT GGA TAC TCT TTG G 3' und

5 5' CTG CGG ATA GTG AGG TTC 3';

Es wurde eine Sonde mit 365 Basenpaaren erhalten. Ein Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde zugegeben und mit dem NBT/BCIP Färbe-Kit angefärbt (DAKO, Hamburg).

- 10 Bei einer semi-quantitativen Analyse der mRNA Expression in den Herzkranzarterien ist die mRNA für KDR/flk-1 nach 4 Tagen in transfizierten Gefäßen nachweisbar durch in-situ-Hybridisierung. Die Expression zeigte ein Maximum nach 7 Tagen, nach 4 Wochen ist keine mRNA mehr nachweisbar. Im Unterschied dazu zeigt sich in LacZ transfizierten Gefäßen ein positiver
- 15 Nachweis in deutlich geringerem Ausmaß. Abbildung 2 zeigt einen typischen Befund nach 7 Tagen in transfizierten Gefäßen. Hierbei ist eine Anfärbung besonders in periluminalen Zellschichten zu sehen, sie ist in KDR/flk-1-transfizierten Gefäßen allerdings erheblich intensiver. Der Zeitverlauf der KDR/flk-1 mRNA Expression in beiden Behandlungsgruppen ist in Abb. 2
- 20 dargestellt.

Die dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) oder Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) (jeweils wie angemessen) angegeben. Neointima-Dicke, Neointima- und Lumenfläche nach KDR-

25 Transfektion wurden mit LacZ-Kontrollen mittels des Wilcoxon signed Rank-Test für abhängige Variablen verglichen.

Patentansprüche

1. Verwendung eines VEGF-Rezeptorgens oder -genprodukts zur Herstellung einer Zubereitung zur Vorbeugung und Behandlung von mit überschießender Neointimaproliferation einhergehenden Zuständen und Krankheiten, insbesondere von Arteriosklerose und Ischämie, zur Förderung einer Neovaskularisation und zur unterstützenden Therapie bei Shunts, zur lokalen Behandlung von Schädigungsgebieten des Gefäßendothels, insbesondere vor, während oder nach Angioplastie, sowie zur Restenose-Prophylaxe.
2. Verwendung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung als VEGF-Rezeptorgen eine für KDR kodierende Sequenz enthält und/oder als Genprodukt KDR (kinase insert domain-containing receptor).
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen/die Sequenz in einem Expressionsvektor, vorzugsweise in funktioneller Zuordnung zu einem Promotor, enthalten ist.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Genprodukt in Zuordnung zu einer Transport-Einheit, insbesondere in Verbindung mit einem Transportprotein, vorliegt.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung zusätzlich Mittel zur Modulation der Synthese, Expression und/oder Stabilität einer für einen VEGF-Rezeptor kodierenden mRNA enthält.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung weitere pharmazeutisch verträgliche Zusatz- und Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthält.

- 20 -

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 65, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung innerhalb einer Vorrichtung zu ihrer Zuführung oder auf, an oder in einem Implantat, insbesondere einem Stent, vorgehalten wird.

5

8. Verwendung eines VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukts zur Vorbeugung und Behandlung von mit überschießender Neointimaproliferation einhergehenden Zuständen und Krankheiten, insbesondere von Arteriosklerose und Ischämie, zur Förderung von Neovaskularisation und zur unterstützenden Therapie bei Shunts, zur lokalen Behandlung von Schädigungsgebieten des Gefäßendothels, insbesondere vor, während oder nach Angioplastie, sowie zur Restenose-Prophylaxe.

10

9. Verwendung von VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt gemäß Anspruch 8 zur Therapie in der Ballonkatheter-gestützten Erweiterung bei verengten Herzkranzgefäßen.

15

10. Verwendung gemäß Anspruch 8 oder 9 wobei ein VEGF-Rezeptorgen in einem Expressionsvektor verwendet wird.

20

11. Verwendung gemäß Anspruch 10, wobei eine transiente Expression des VEGF-Rezeptors induziert wird.

12. Verwendung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, wobei das VEGF-Rezeptorgen oder -genprodukt in eingekapselter Form von Nanopartikeln, Mikropartikeln, Mikrosphären, kontrollierten Freisetzungssystem oder einer Lösung vorliegt.

25

13. Verwendung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, wobei das VEGF Rezeptor Gen oder Genprodukt in oder auf einem Stent imprägniert ist oder in einem Infiltrations- oder Seitenloch-Ballonkatheter vorgehalten wird.

30

- 21 -

14. Vorrichtung zum Einsatz innerhalb von Blutgefäßen insbesondere Stent oder Katheter, enthaltend eine wirksame Menge eines VEGF-Rezeptorgens oder einen VEGF-Rezeptor oder funktionelle Teile davon mit gleicher biologischer
- 5 Wirkung.

CMV-Promotor - Nachweis

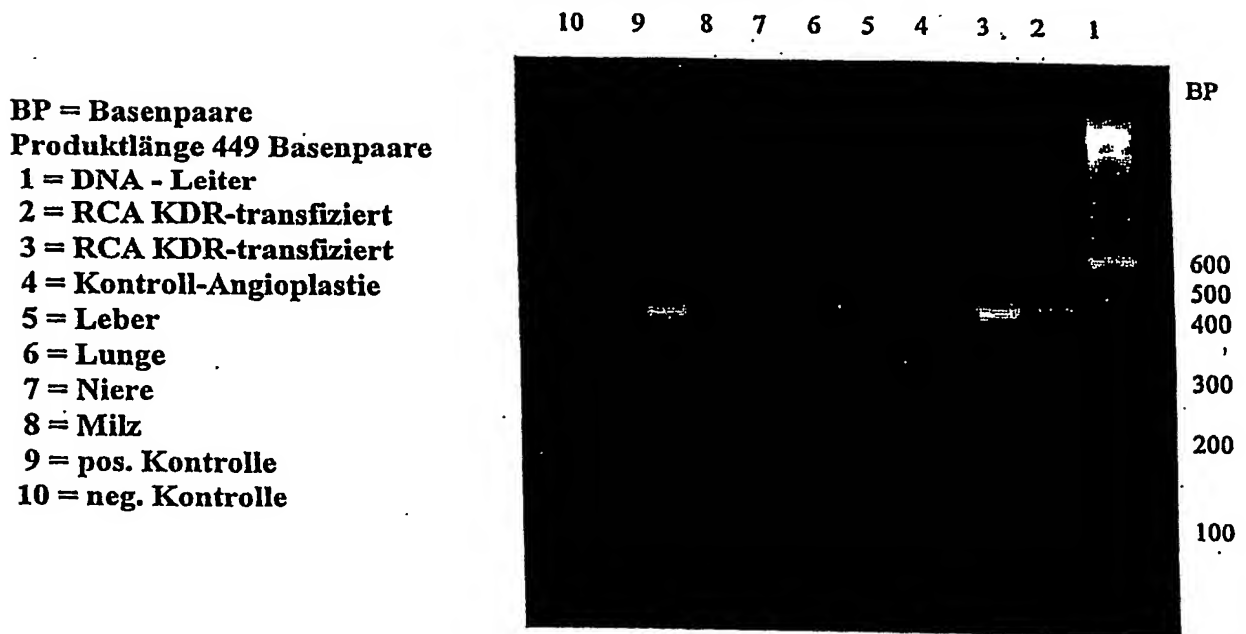


Abb. 1

Time course of KDR/flk-1 mRNA expression

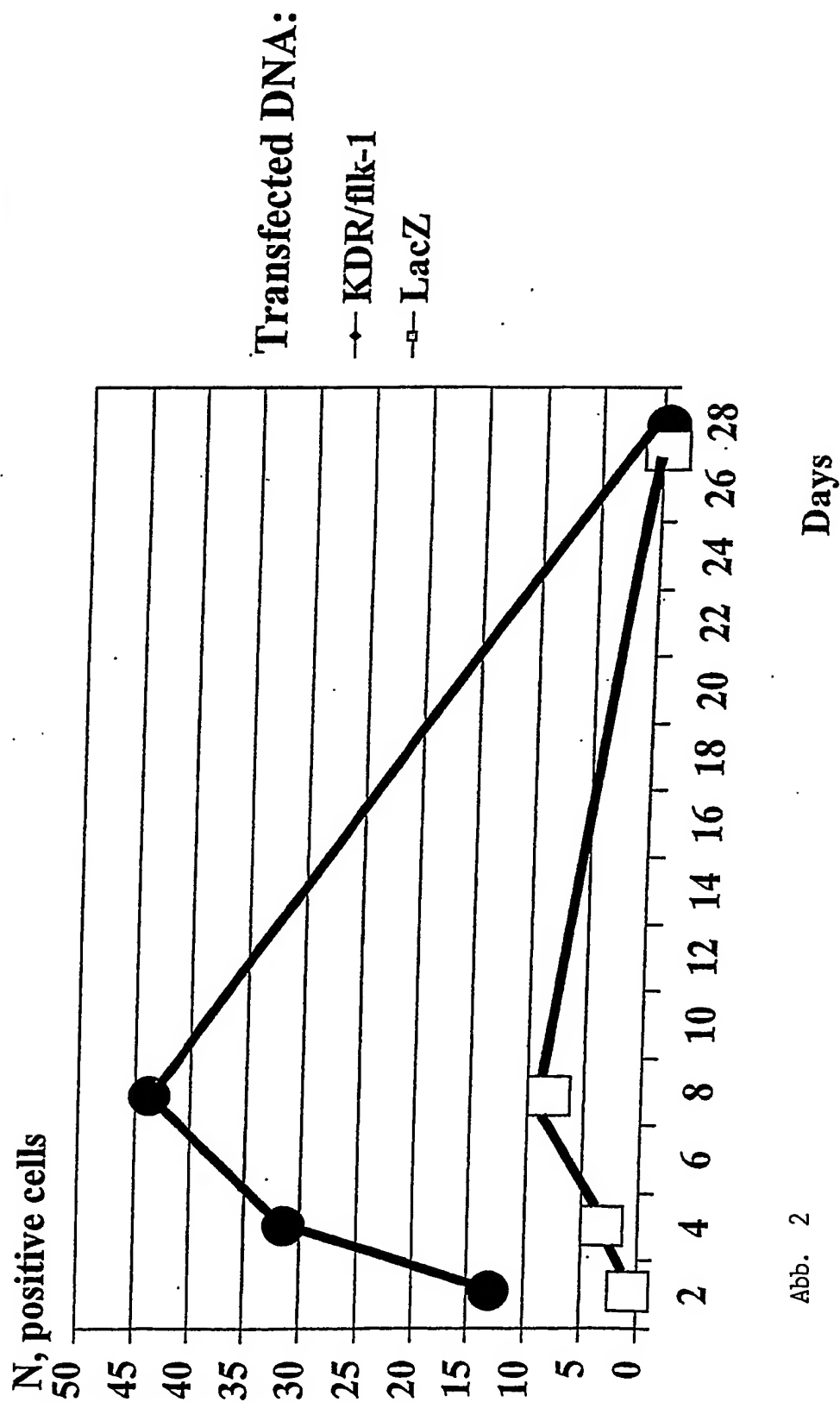


Abb. 2

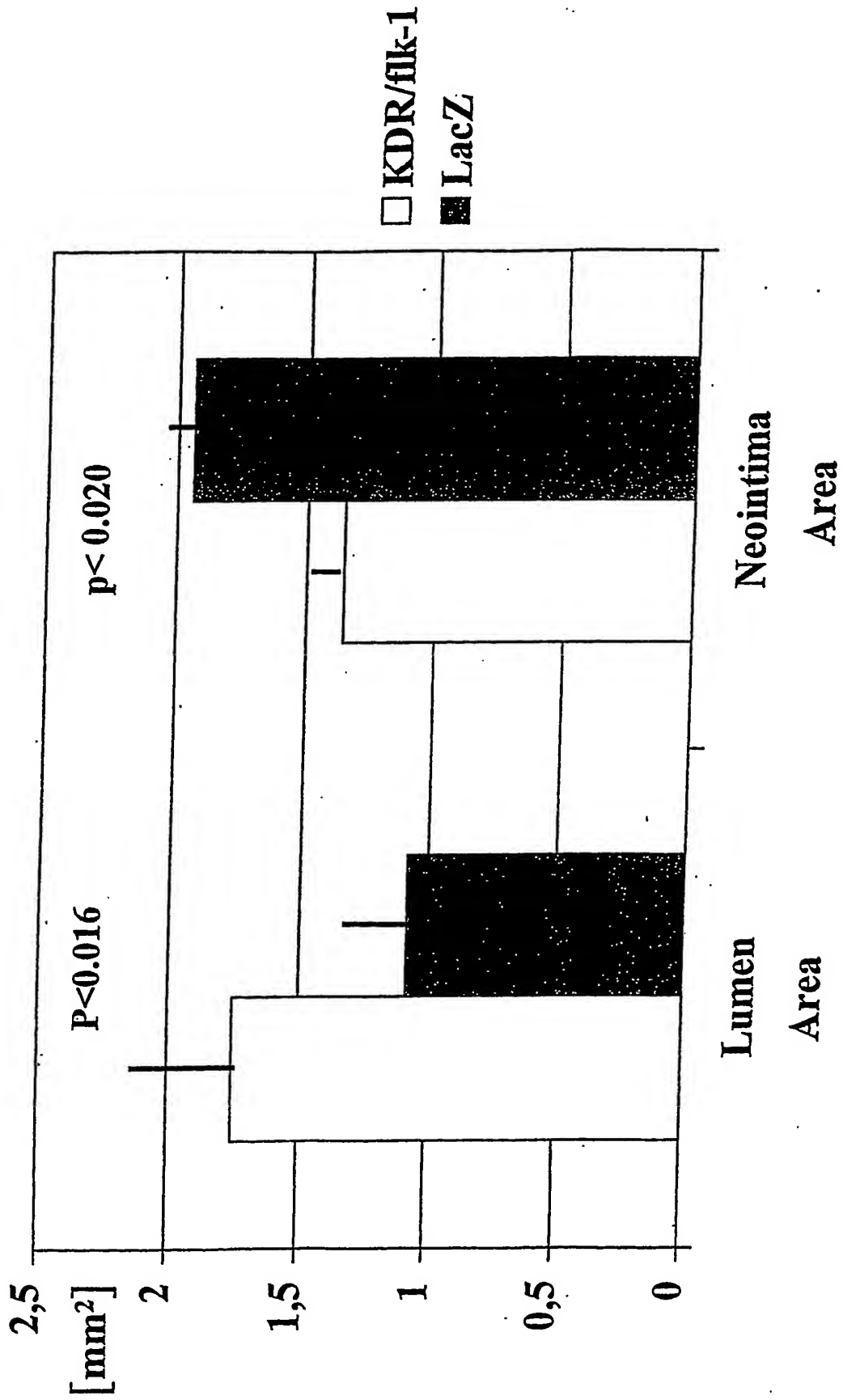


Abb. 3

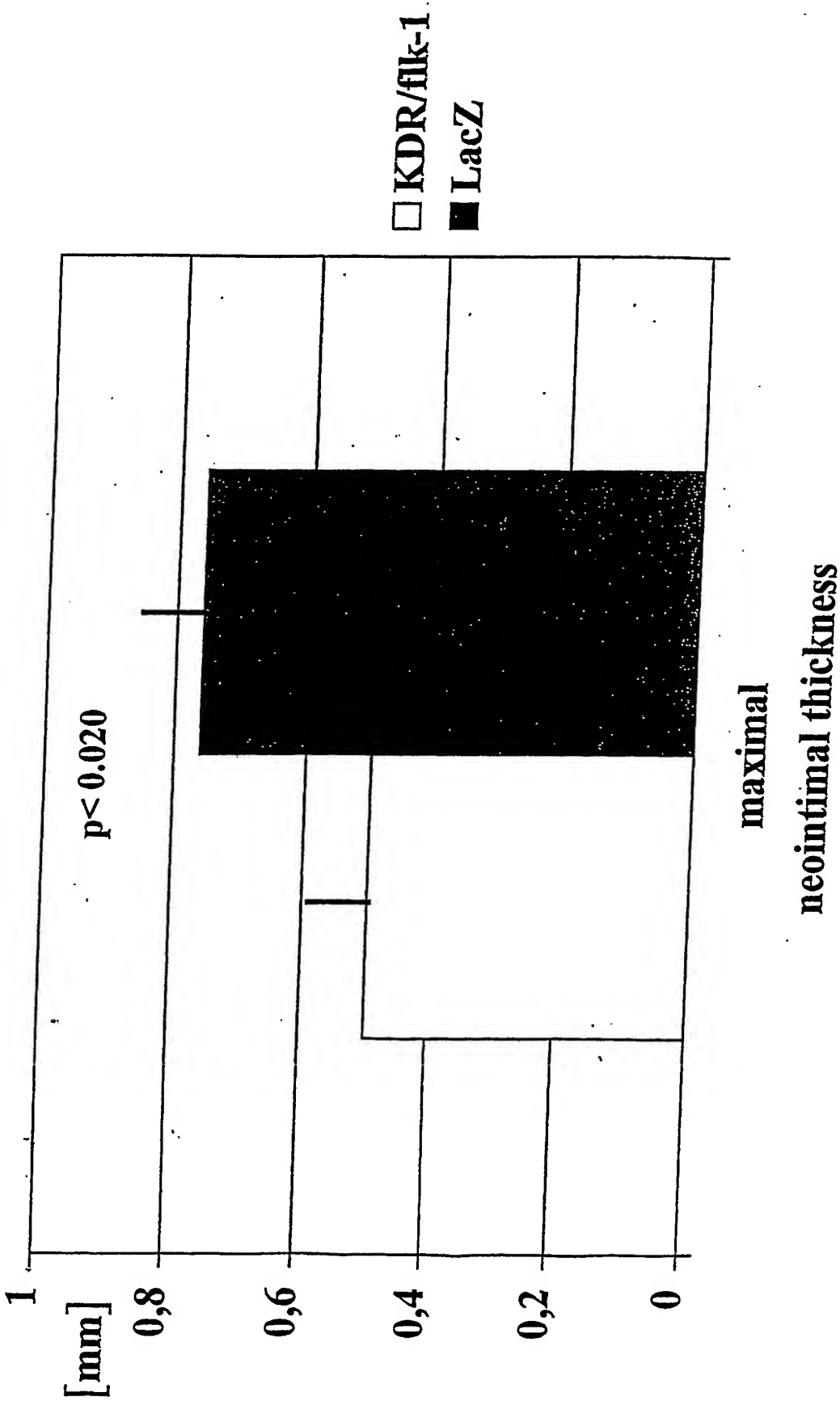


Abb. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 03/02048

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/71 A61K48/00 A61K38/17 A61P9/10 A61F2/06
A61M25/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KENDALL R L ET AL: "IDENTIFICATION OF A NATURAL SOLUBLE FORM OF THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR, FLT-1, AND ITS HETERODIMERIZATION WITH KDR" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 226, no. 2, 13 September 1996 (1996-09-13), pages 324-328, XP000611908 ISSN: 0006-291X page 327, last paragraph -page 328, paragraph 1	1-14
Y	US 5 851 999 A (MILLAUER BIRGIT ET AL) 22 December 1998 (1998-12-22) claims 1-32 column 27 -column 30	1-14
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 October 2003

Date of mailing of the international search report

13/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Heiduschat, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 03/02048

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FREEDMAN S B ET AL: "THERAPEUTIC ANGIOGENESIS FOR ISCHEMIC CARDIOVASCULAR DISEASE" JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, XX, XX, vol. 33, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 379-393, XP001057080 ISSN: 0022-2828 the whole document	1-14
Y	EPSTEIN S E ET AL: "Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects." CIRCULATION. UNITED STATES 3 JUL 2001, vol. 104, no. 1, 3 July 2001 (2001-07-03), pages 115-119, XP002259593 ISSN: 1524-4539 page 116, right-hand column, paragraph 3 -page 118, left-hand column, paragraph 4	1-14
A	WO 97 12519 A (ST ELIZABETH S MEDICAL CENTER) 10 April 1997 (1997-04-10) page 3, line 5 -page 5, line 13 claims 1-13	1-14
A	WO 98 20027 A (YLAE HERTTUALA SEPPO ;MARTIN JOHN FRANCIS (GB); BARKER STEPHEN GEO) 14 May 1998 (1998-05-14) page 33 -page 41; examples 1,2	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/02048

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5851999	A	22-12-1998	US 6177401 B1	23-01-2001
			AU 1842395 A	29-08-1995
			CA 2182949 A1	17-08-1995
			EP 0748219 A1	18-12-1996
			JP 2000026393 A	25-01-2000
			JP 3202238 B2	27-08-2001
			JP 9508642 T	02-09-1997
			WO 9521613 A1	17-08-1995
			US 5712395 A	27-01-1998
			US 5763441 A	09-06-1998
			US 5792771 A	11-08-1998
			US 5981569 A	09-11-1999
			US 2002081650 A1	27-06-2002
			US 5849742 A	15-12-1998
			AT 238418 T	15-05-2003
			AU 5562794 A	08-06-1994
			CA 2149298 A1	26-05-1994
			CN 1094445 A	02-11-1994
			DE 69332907 D1	28-05-2003
			DK 669978 T3	11-08-2003
			WO 9411499 A1	26-05-1994
			EP 0669978 A1	06-09-1995
			JP 8505763 T	25-06-1996
WO 9712519	A	10-04-1997	US 5830879 A	03-11-1998
			AU 725499 B2	12-10-2000
			AU 7386196 A	28-04-1997
			CA 2233499 A1	10-04-1997
			EP 0853450 A1	22-07-1998
			JP 2000505780 T	16-05-2000
			WO 9712519 A1	10-04-1997
			US 6258787 B1	10-07-2001
WO 9820027	A	14-05-1998	AU 729420 B2	01-02-2001
			AU 4790697 A	29-05-1998
			EP 0941116 A2	15-09-1999
			WO 9820027 A2	14-05-1998
			JP 2001503755 T	21-03-2001
			KR 2000052999 A	25-08-2000
			NO 992106 A	30-06-1999
			PL 333272 A1	22-11-1999

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/02048

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/71 A61K48/00 A61K38/17 A61P9/10 A61F2/06
A61M25/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KENDALL R L ET AL: "IDENTIFICATION OF A NATURAL SOLUBLE FORM OF THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR, FLT-1, AND ITS HETERODIMERIZATION WITH KDR" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, Bd. 226, Nr. 2, 13. September 1996 (1996-09-13), Seiten 324-328, XP000611908 ISSN: 0006-291X Seite 327, letzter Absatz -Seite 328, Absatz 1	1-14
Y	US 5 851 999 A (MILLAUER BIRGIT ET AL) 22. Dezember 1998 (1998-12-22) Ansprüche 1-32 Spalte 27 -Spalte 30	1-14
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Oktober 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/11/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heiduschat, C

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/02048

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	FREEDMAN S B ET AL: "THERAPEUTIC ANGIOGENESIS FOR ISCHEMIC CARDIOVASCULAR DISEASE" JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, XX, XX, Bd. 33, Nr. 3, März 2001 (2001-03), Seiten 379-393, XP001057080 ISSN: 0022-2828 das ganze Dokument	1-14
Y	EPSTEIN S E ET AL: "Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects." CIRCULATION. UNITED STATES 3 JUL 2001, Bd. 104, Nr. 1, 3. Juli 2001 (2001-07-03), Seiten 115-119, XP002259593 ISSN: 1524-4539 Seite 116, rechte Spalte, Absatz 3 -Seite 118, linke Spalte, Absatz 4	1-14
A	WO 97 12519 A (ST ELIZABETH S MEDICAL CENTER) 10. April 1997 (1997-04-10) Seite 3, Zeile 5 -Seite 5, Zeile 13 Ansprüche 1-13	1-14
A	WO 98 20027 A (YLAE HERTTUALA SEPPO ;MARTIN JOHN FRANCIS (GB); BARKER STEPHEN GEO) 14. Mai 1998 (1998-05-14) Seite 33 -Seite 41; Beispiele 1,2	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 03/02048

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
 Obwohl die Ansprüche 8 bis 13 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/DE 03/02048

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5851999	A	22-12-1998	US 6177401 B1 23-01-2001
		AU 1842395 A 29-08-1995	
		CA 2182949 A1 17-08-1995	
		EP 0748219 A1 18-12-1996	
		JP 2000026393 A 25-01-2000	
		JP 3202238 B2 27-08-2001	
		JP 9508642 T 02-09-1997	
		WO 9521613 A1 17-08-1995	
		US 5712395 A 27-01-1998	
		US 5763441 A 09-06-1998	
		US 5792771 A 11-08-1998	
		US 5981569 A 09-11-1999	
		US 2002081650 A1 27-06-2002	
		US 5849742 A 15-12-1998	
		AT 238418 T 15-05-2003	
		AU 5562794 A 08-06-1994	
		CA 2149298 A1 26-05-1994	
		CN 1094445 A 02-11-1994	
		DE 69332907 D1 28-05-2003	
		DK 669978 T3 11-08-2003	
		WO 9411499 A1 26-05-1994	
		EP 0669978 A1 06-09-1995	
		JP 8505763 T 25-06-1996	
WO 9712519	A	10-04-1997	US 5830879 A 03-11-1998
		AU 725499 B2 12-10-2000	
		AU 7386196 A 28-04-1997	
		CA 2233499 A1 10-04-1997	
		EP 0853450 A1 22-07-1998	
		JP 2000505780 T 16-05-2000	
		WO 9712519 A1 10-04-1997	
		US 6258787 B1 10-07-2001	
WO 9820027	A	14-05-1998	AU 729420 B2 01-02-2001
		AU 4790697 A 29-05-1998	
		EP 0941116 A2 15-09-1999	
		WO 9820027 A2 14-05-1998	
		JP 2001503755 T 21-03-2001	
		KR 2000052999 A 25-08-2000	
		NO 992106 A 30-06-1999	
		PL 333272 A1 22-11-1999	